



⑮ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 195 08 672 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**C 07 K 14/435**  
A 61 K 38/17

②① Aktenzeichen: 195 08 672.4  
②② Anmeldetag: 10. 3. 95  
②③ Offenlegungstag: 12. 9. 96

DE 195 08 672 A 1

⑦① Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦② Erfinder:

Esswein, Angelika, Dipl.-Chem. Dr., 78224 Singen,  
DE; Hoffmann, Eike, Dipl.-Chem. Dr., 68519  
Viernheim, DE; Honold, Konrad, Dipl.-Biol. Dr., 82377  
Penzberg, DE; Schäfer, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr.,  
68199 Mannheim, DE; Dony, Carola, Dipl.-Biol. Dr.,  
81477 München, DE

⑤④ Neue cyclische Parathormonfragmente, Verfahren zu deren Herstellung und diese enthaltende Arzneimittel

⑤⑦ Die Erfindung betrifft neue cyclische Parathormonfragmente, Verfahren zu deren Herstellung sowie Arzneimittel, die diese Parathormonfragmente enthalten. Die cyclischen Parathormonfragmente umfassen die Aminosäuresequenzen von hPTH(1-34), bPTH(1-34), pPTH(1-34), rPTH(1-34) oder cPTH(1-34), die am C-terminalen Ende gegebenenfalls um bis zu vier Aminosäuren verlängert und am N-terminalen Ende gegebenenfalls um bis zu drei Aminosäuren verkürzt sein können, wobei die Cyclisierung jeweils zwischen den Aminosäuren der Positionen 13 und 17 vorliegt und entweder die Aminosäure in Position 13 L-Orn, D-Orn, L-Lys oder D-Lys ist, während die Aminosäure in Position 17 L-Glu, D-Glu, L-Asp oder D-Asp ist  
oder  
die Aminosäure in Position 13 L-Glu, D-Glu, L-Asp oder D-Asp ist, während die Aminosäure in Position 17 L-Orn, D-Orn, L-Lys oder D-Lys ist.

DE 195 08 672 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 07. 96 602 037/491

12/25

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Parathormonfragmente, Verfahren zu deren Herstellung sowie Arzneimittel, die diese enthalten.

Das Parathyroidhormon (PTH), ein Hormon (84 Aminosäuren) der Nebenschilddrüsen, ist ein wichtiger Regulator zur Aufrechterhaltung des Calciumspiegels im Körper. PTH kann die Knochenbildung oder Knochenresorption stimulieren. Es wirkt dabei als regulatorisches Hormon auf eine Reihe von Enzymen, unter anderem auf die Ornithindecarboxylase und Adenylatcyclase (cAMP-Synthese). PTH mobilisiert bei Calciummangel Calcium aus dem Knochen, verringert die Calciumausscheidung der Nieren und verbessert gleichzeitig die Resorption von Calcium aus dem Darm durch erhöhte Synthese von  $1,25-(OH)_2D_3$ . Durch die Wirkung auf diese Zielorgane wird eine Normalisierung des Calciumspiegels erreicht. Umgekehrt wird bei erhöhtem Calciumspiegel der Einbau von Calcium in den Knochen stimuliert. Ferner zeigt PTH einen mitogenen Effekt, insbesondere eine Stimulation von Osteoblasten und Chondrocyten.

Aus der DE-OS 37 25 319 ist ferner bekannt, daß die oben genannten Effekte durch einen speziellen Bereich des PTH bewirkt werden und daß es möglich ist, durch Gabe von PTH-Fragmenten, welche diesem Bereich entsprechen, die gleiche Wirkung zu erzielen (siehe auch Sömjen et al., Biochem. J. 272, 781—5 (1990); Shurtz-Swirski et al. Acta Endocrinol. 122, 217—26 (1990) und Potts et al. Adv. in Protein Chem. 35 323—96 (1982)). Dieser Literatur ist auch zu entnehmen, wie solche PTH-Fragmente hergestellt und variiert werden können, wobei sowohl eine Spaltung des natürlich vorkommenden PTH als auch chemisch-synthetische oder gentechnische Verfahren möglich sind.

Hefti et al. berichteten, daß tägliche s.c. Injektionen von bPTH(1-84) oder hPTH(1-34) sowohl zu einer Erhöhung des Gesamtcalciums als auch des Aschgewichts in normalen und osteoporotischen Ratten führten (Clin. Sciences 62, 389—96, 1982). Liu et al. konnten zeigen, daß der durch Ovariectomie in erwachsenen Ratten herbeigeführte trabekuläre Knochenverlust von 47% in der Metaphyse der proximalen Tibia mit einer signifikanten Erhöhung der Osteoblasten- und Osteoclastenzahl einhergeht. Tägliche s.c. Injektionen von hPTH(1-34) führten zu einer vollständigen Kompensation des trabekulären Knochenabbaus und ergaben sogar eine höhere trabekuläre Knochenmasse als bei shamoperierten Kontrollen. Die Anzahl der Osteoblasten war gestiegen, während die Zahl der Osteoclasten abgenommen hatte (JBMR 6 (10), 1071—80, 1991). Untersuchungen von Hock et al. in gesunden erwachsenen männlichen Ratten ergaben, daß tägliche s.c. Injektionen von hPTH(1-34) über 12 Tage zu einer Zunahme der Osteoblastenoberfläche und des Calciums im trabekulären und kortikalen Knochen führten. Das Trockengewicht, die Gesamtknochenmasse, das trabekuläre Knochenvolumen, sowie die Dicke und Anzahl der Trabekel waren erhöht (JBMR, 7(1), 65—71, 1992).

PTH-Fragmente sind insbesondere für die Behandlung der Osteoporose interessant und spielen auch eine Rolle in der Physiologie der Haut (PNAS 91 8014-6, 1994), indem sie eine antiproliferative Wirkung auf die epidermale Zellproliferation zeigen.

Allerdings hat sich bei der Behandlung der Osteoporose gezeigt, daß die Fragmente unterschiedlich wirksam sind und daß in einigen Fällen, z. B. bei der Anwendung des hPTH(1-34) beim Menschen die Wirkung bei einigen Patienten positiv ist, bei anderen aber eine Verschlechterung der Calciumretention eintrat und die Gesamtknochenmasse während der Behandlung zurückging. Die Halbwertszeiten der bisher bekannten PTH-Fragmente sind außerordentlich kurz.

Es ist deshalb die Aufgabe der Erfindung, neue PTH-Fragmente zur Verfügung zu stellen, die eine verbesserte therapeutische Wirkung, insbesondere bei der Regulierung des Calciumspiegels im Körper und beim Einbau von Calcium in den Knochen haben. Außerdem sollen sich diese Fragmente mit einem relativ geringen Aufwand in guter Ausbeute herstellen lassen und günstige Halbwertszeiten aufweisen. Durch die antiproliferative Wirkung auf die epidermale Zellproliferation sollen die PTH-Fragmente auch für den klinischen Einsatz zur Behandlung von Hautkrankheiten, wie z. B. Psoriasis, verwendet werden können.

Diese Aufgabe wird mit neuen cyclischen PTH-Fragmenten gelöst, die die Aminosäuresequenzen von hPTH(1-34), bPTH(1-34), pPTH(1-34), rPTH(1-34) oder cPTH(1-34) umfassen, wobei das C-terminale Ende dieser Sequenzen gegebenenfalls um bis zu 4 Aminosäuren verlängert und das N-terminale Ende gegebenenfalls um bis zu 3 Aminosäuren verkürzt sein kann, wobei die Cyclisierung jeweils zwischen den Aminosäuren der Positionen 13 und 17 vorliegt.

Im Sequenzprotokoll entspricht:

SEQ ID NO: 1: hPTH(1-34),

SEQ ID NO: 2: bPTH(1-34),

SEQ ID NO: 3: rPTH(1-34),

SEQ ID NO: 4: pPTH(1-34)

und

SEQ ID NO: 5: cPTH(1-34).

Die Cyclisierung erfolgt jeweils über Xaa<sup>13</sup>—Xaa<sup>17</sup> durch Lactamisierung, wobei

Xaa<sup>13</sup> L—Orn, D—Orn, L—Lys oder D—Lys darstellt

und

Xaa<sup>17</sup> L—Glu, D—Glu, L—Asp oder D—Asp ist

oder

Xaa<sup>13</sup> L—Glu, D—Glu, L—Asp oder D—Asp

und

Xaa<sup>17</sup> L—Orn, D—Orn, L—Lys oder D—Lys

sein kann.

Zur Stabilisierung der Peptide kann zusätzlich Methionin durch Norleucin ersetzt werden. Ein Austausch der

C-terminalen Aminosäure zur Stabilisierung ist ebenfalls möglich, z. B.  $^{34}\text{Phe}$  durch  $^{34}\text{Tyr}$  in hPTH(1-34).

Die Carboxylgruppe der Aminosäure am C-terminalen Ende kann in freier Form oder in Form eines physiologisch verträglichen Alkali- oder Erdalkalisalzes, wie z. B. des Natrium-, Kalium- oder Calciumsalzes vorliegen. Die Carboxylgruppe kann auch amidiert sein und eine Gruppe der Formel  $-\text{CONR}^1\text{R}^2$  darstellen, wobei  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$  gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine  $\text{C}_1-\text{C}_6$ -Alkylgruppe bedeuten. Insbesondere kann einer der Reste  $\text{R}^1$  oder  $\text{R}^2$  Wasserstoff und der andere Methyl darstellen, oder beide Reste  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$  bedeuten Methyl.

Besonders bevorzugt in diesem Sinne sind die folgenden cyclischen Fragmente, insbesondere die entsprechenden hPTH-Fragmente, als Carbonsäuren oder Amide, deren Sequenzen im Sequenzprotokoll unter folgenden Nummern aufgeführt sind:

SEQ ID NO: 6,

SEQ ID NO: 7,

SEQ ID NO: 8,

SEQ ID NO: 9,

SEQ ID NO: 10,

SEQ ID NO: 11,

SEQ ID NO: 12,

SEQ ID NO: 13,

SEQ ID NO: 14.

Die verwendeten Abkürzungen und Definitionen der Aminosäuren wurden in Pure Appl. Chem. 31, 639–45 (1972) und ibid. 40, 277–90 (1974) empfohlen und stimmen mit den PCT-Regeln (WIPO Standard St.23: Recommendation for the Presentation of Nucleotide and Amino Acid Sequences in Patent Applications and in Published Patent Documents) überein. Die Ein- bzw. Drei-Buchstabencodes sind wie folgt:

#### Aminosäureabkürzungen

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Symbol	Ein-Buchstaben-Symbol
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
andere Aminosäuren	aa	X

Die Abkürzungen stehen für L-Aminosäuren, falls keine weitere Spezifikation wie D- oder D,L- angegeben wird. Bestimmte Aminosäuren, natürliche wie nichtnatürliche, sind achiral, z. B. Glycin. Bei der Darstellung aller Peptide befindet sich das N-terminale Ende links und das C-terminale Ende rechts. Für die nichtnatürlichen Aminosäuren wurden folgende Abkürzungen verwendet:

- 5 Orn Ornithin  
Nle Norleucin.

Die erfindungsgemäßen PTH-Fragmente besitzen vorteilhafte therapeutische Eigenschaften. Insbesondere läßt sich mit ihnen nicht nur der Calciumspiegel im Körper regulieren, sondern auch der Einbau von Calcium in die Knochen gezielt fördern, weshalb sie den Verlauf der Osteoporose günstig beeinflussen bzw. diese zum Stillstand bringen können. Gegenüber den bekannten Fragmenten hPTH (1-n) mit  $n = 34, 35, 36, 37$  oder 38 besitzen die erfindungsgemäßen PTH-Fragmente eine überraschend höhere Wirksamkeit in verschiedenen Testsystemen, so daß sie für eine therapeutische Anwendung besser geeignet sind als die bisher bekannten Fragmente. Die Vorteile der neuen cyclisierten Fragmente sind insbesondere die folgenden: stärkere Mitogenität und DNA-Syntheseleistung; geringere katabole, calciummobilisierende Wirkung; Steigerung der Calciumretention und verstärkter Calciumeinbau in den Knochen, günstigere Halbwertszeiten.

15 Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch Arzneimittel, welche die erfindungsgemäßen Fragmente einzeln oder zusammen als aktiven Wirkstoff neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen enthalten, werden vorzugsweise parenteral (subcutan, intramuskulär oder intravenös) verabreicht. In Frage kommen aber auch alle sonst üblichen Applikationsverfahren wie oral, rectal, buccal (einschließlich sublingual), pulmonal, transdermal, iontophoretisch, vaginal und intranasal. Das Arzneimittel hat eine calciumregulierende Wirkung und fördert dabei in vorteilhafter Weise den Einbau von Calcium in die Knochen. Vorteilhaft für die Anwendung des Arzneimittels ist es, wenn es den Wirkstoff in Mengen von 0,002 bis 10 µg pro kg Körpergewicht pro Tag enthält. Eine gute Wirkung wird insbesondere dann erzielt, wenn die Dosis zwischen 0,1 und 5 µg pro kg Körpergewicht pro Tag liegt.

25 Die erfindungsgemäßen PTH-Fragmente oder pharmakologisch verträglichen Salze hiervon werden vorzugsweise als sterile Lyophilisate gelagert und vor der Injektion mit einer geeigneten isotonischen Lösung vermischt. In dieser Form können die Fragmente dann injiziert, infundiert oder gegebenenfalls auch durch die Schleimhäute absorbiert werden. Als Lösungsmittel können die üblichen, für die Injektion oder Infusion geeigneten isotonischen, wäßrigen Systeme, die die bei Injektionslösungen üblichen Zusätze wie Stabilisierungsmittel und Lösungsvermittler enthalten, verwendet werden. Physiologische Kochsalzlösung oder gegebenenfalls durch Puffer isotonisch gestellte Lösungen werden in diesem Fall bevorzugt.

30 Zusätze sind z. B. Tartrat- oder Citratpuffer, Ethanol, Komplexbildner (wie Ethylendiamintetraessigsäure und deren nichttoxische Salze), hochmolekulare Polymere (wie flüssiges Polyethylenoxid) zur Viskositätsregelung. Flüssige Trägerstoffe für Injektionslösungen müssen steril sein und werden vorzugsweise in Ampullen abgefüllt. Feste Trägerstoffe sind z. B. Stärke, Lactose, Mannit, Methylcellulose, Talkum, hochdisperse Kieselsäuren, höhermolekulare Fettsäuren (wie Stearinsäure), Gelantine, Agar-Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette, feste hochmolekulare polymere (wie Polyethylenglykole); für orale Applikation geeignete Zubereitungen können gewünschtenfalls Geschmacks- und Süßstoffe enthalten. Für die nasale Applikation können Surfactants zur Verbesserung der Absorption durch die nasale Schleimhaut zugesetzt werden, z. B. Cholsäure, Taurocholsäure, Chenodeoxycholsäure, Glykocholsäure, Dehydrocholsäure, Deoxycholsäure und Cyclodextrine.

40 Die zu verabreichende Tagesdosis hängt von der Indikation ab. Bei der Prävention und Therapie der Osteoporose durch i.v./i.m. Injektion liegt sie im Bereich von 5 bis 500 µg/Tag, bei täglicher subcutaner Injektion vorzugsweise bei 10 bis 1000 µg/Tag. Die Bestimmung der biologischen Aktivität basiert auf Messungen gegen internationale Referenzpräparationen für hPTH-Fragmente in einem gebräuchlichen biologischen Testverfahren für hPTH-Fragmente.

45 Gegenstand der Erfindung sind neben neuen cyclischen PTH-Fragmenten und Arzneimitteln enthaltend diese Fragmente ferner Verfahren zur Herstellung dieser Fragmente, bei denen man die Fragmente in Festphasensynthese aus geschützten, in den Fragmenten enthaltenen Aminosäuren herstellt, die in den Reihenfolgen aneinander gekoppelt werden, welche den Aminosäuresequenzen in den Fragmenten entsprechen und welche gegebenenfalls durch entsprechende unnatürliche Aminosäuren ergänzt wurden.

50 Die Festphasen- und Flüssigphasensynthese ist ein übliches Verfahren zur Herstellung von cyclisierten Peptiden. Um das Verfahren für die Herstellung eines bestimmten Produktes im Hinblick auf die Reinheit des Rohproduktes und die Ausbeute zu optimieren, ist es erforderlich, die Prozeßparameter und die verwendeten Materialien, beispielsweise die Materialien für das Blockieren der Gruppen, welche nicht reagieren sollen, oder die Reagenzien, welche blockierende Materialien abspalten, an das herzustellende Produkt, an die herzustellenden Zwischenprodukte bzw. Ausgangsmaterialien anzupassen. Diese Anpassung ist angesichts der Interpendenz der vielen Verfahrensparameter nicht einfach.

55 Die erfindungsgemäßen PTH-Fragmente können nach den in der Peptidsynthese üblichen Verfahren hergestellt werden, wie sie z. B. in J.M. Stewart und J.D. Young "Solid Phase Peptide Synthesis", 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois (1984) und J. Meienhofer "Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 2, Academic Press, New York (1973) für die Festphasensynthese und E. Schroder und K. Lubke "The Peptides", Vol. 1, Academic Press, New York, (1965) für die Flüssigsynthese beschrieben worden sind.

60 Im allgemeinen wegen bei der Synthese von Peptiden geschützte Aminosäuren zu einer wachsenden Peptidkette addiert. Die erste Aminosäure ist entweder an der Aminogruppe oder der Carboxylgruppe sowie an jeglicher reaktiven Gruppe in der Seitenkette geschützt. Diese geschützte Aminosäure wird entweder an einen inerten Träger gekoppelt, kann aber auch in Lösung eingesetzt werden. Die nächste Aminosäure in der Peptidsequenz wird passend geschützt und unter Bedingungen, welche die Ausbildung einer Amidbindung begünstigen,

zu der ersten gegeben. Nachdem alle gewünschten Aminosäuren in der richtigen sequentiellen Folge gekuppelt wurden, werden die Schutzgruppen und gegebenenfalls die Trägphase abgespalten. Das erhaltene rohe Polypeptid wird entsalzt und vorzugsweise chromatographisch zum Endprodukt gereinigt.

Eine bevorzugte Methode zur Darstellung von Analoga physiologisch aktiver Polypeptide, mit weniger als etwa vierzig Aminosäuren, ist die Festphasenpeptidsynthese. Bei dieser Methode werden die  $\alpha$ -Aminofunktionen ( $N^{\alpha}$ ) und jegliche reaktive Seitenketten mit säure- oder basenlabilen Gruppen geschützt. Die verwendeten Schutzgruppen sollten unter den Bedingungen der Knüpfung von Amidbindungen stabil sein, sich danach aber leicht abspalten lassen ohne die entstandene Polypeptidkette zu beeinträchtigen. Zu den geeigneten Schutzgruppen für die  $\alpha$ -Aminofunktion gehören die folgenden Gruppen, sind aber nicht auf diese limitiert: t-Butyloxycarbonyl (Boc), Benzyloxycarbonyl (Z), o-Chlorbenzyloxycarbonyl, Biphenylisopropylloxycarbonyl, tert.-Amyloxycarbonyl (Amoc),  $\alpha,\alpha$ -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, o-Nitrosulfonyl, 2-Cyano-t-butoxycarbonyl, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl (Dde) und ähnliche. Vorzugsweise wird t-Butyloxycarbonyl (Boc) als  $N^{\alpha}$ -Schutzgruppe eingesetzt.

Zu den geeigneten Seitenkettenschutzgruppen gehören die folgenden, sind aber nicht auf diese limitiert: Acetyl, Allyl, Benzyl (Bzl), Benzyloxycarbonyl (Z), Benzyloxymethyl (Bom), o-Brombenzyloxycarbonyl, t-Butyl, t-Butyldimethylsilyl, 2-Chlorbenzyl, 2-Chlorbenzyloxycarbonyl (2-ClZ), 2,6-Dichlorbenzyl, Cyclohexyl, Cyclopentyl, 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl (Dde), Isopropyl, 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzylsulfonyl (Mtr), 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc), Pivalyl, Tetrahydropyran-2-yl, Tosyl (Tos), 2,4,6-Trime-thoxybenzyl, Trimethylsilyl und Trityl (Trt).

Bei der Festphasensynthese wird die C-terminale Aminosäure als erste an ein geeignetes Trägermaterial gekuppelt. Geeignete Trägermaterialien sind solche, die inert gegen die Reagenzien und die Reaktionsbedingungen der schrittweisen Kondensations- und Abspaltungsreaktionen sind, und welche sich nicht in den benutzten Reaktionsmedien lösen. Beispiele für kommerziell erhältliche Trägermaterialien sind Styrol/Divinylbenzol Copolymerisate, welche mit reaktiven Gruppen und/oder Polyethylenglykol modifiziert wurden, so auch chlormethyliertes Styrol/Divinylbenzol Copolymer, hydroxy- oder aminomethyliertes Styrol/Divinylbenzol Copolymer und ähnliche. Mit 4-(Oxymethyl)phenylacetamido-methyl (PAM) derivatisiertes Polystyrol(1%)divinylbenzol wird bevorzugt eingesetzt, falls die Peptidsäure dargestellt werden soll. Handelt es sich um das Peptidamid, so wird 4-Methyl-benzhydrylamin-polystyrol(1%)divinylbenzol bevorzugt.

Die Anknüpfung an das PAM-Harz kann durch Reaktion der  $N^{\alpha}$ -geschützten Aminosäure, vorzugsweise der Boc-Aminosäure, in Form ihres Ammonium-, Caesium-, Triethylammonium-, 1,5-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-5-en-, Tetra-methylammonium- oder eines ähnlichen Salzes, in Ethanol, Acetonitril, N,N-Dimethylformamid (DMF), Dichlormethan, Tetrahydrofuran, N-Methylpyrrolidon oder ähnlichen Solventien, vorzugsweise dem Caesium-Salz in DMF, mit dem Trägermaterial bei erhöhten Temperaturen, z. B. zwischen 40°C und 60°C, vorzugsweise bei 50°C, und Reaktionszeiten von 12 bis 72 Stunden, vorzugsweise etwa 48 Stunden, erreicht werden.

Die Kupplung der  $N^{\alpha}$ -Boc-Aminosäure an das Benzhydrylamin-Harz kann beispielsweise mit Hilfe von Kupplungsreagenzien wie N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), N,N'-Diisopropylcarbodiimid oder anderen Carbodiimiden, (in Gegenwart oder auch in Abwesenheit von 1-Hydroxybenzotriazol oder 1-Hydrnxy-7-aza-benzo-triazol), 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat (TBTU) oder anderen Uronium-Salzen, O-Acyl-Harnstoffen, Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat (PyBOP) oder anderen Phosphonium-Salzen, N-hydroxysuccinimiden, anderen N-Hydroxyimiden, oder Oximen, vorzugsweise DIC, bei Reaktionszeiten von 2 bis 24 Stunden, vorzugsweise 2 Stunden, und Temperaturen zwischen etwa 10°C und 50°C, vorzugsweise bei 25°C, in einem Lösungsmittel wie Dimethylformamid oder Dichlormethan, vorzugsweise Dichlormethan, durchgeführt werden. Anstelle der Kupplungsreagenzien kann auch der Aktivester (z. B. Pentafluorphenyl, p-Nitrophenyl oder ähnliche) oder das symmetrische Anhydrid der  $N^{\alpha}$ -Boc-Aminosäure unter den oben beschriebenen Bedingungen eingesetzt werden.

Die sukzessive Kupplung der geschützten Aminosäuren kann nach den in der Peptidsynthese üblichen Verfahren typischerweise in einem Peptidsynthese-Automaten durchgeführt werden. Nach Abspaltung der  $N^{\alpha}$ -Boc-Schutzgruppe der gekuppelten Aminosäure auf der Festphase mit Trifluoressigsäure (10% bis 50%), vorzugsweise 25%, in Dichlormethan und nach Neutralisation mit Triethylamin oder einer ähnlichen Base, vorzugsweise 5% Diisopropylethylamin (DIEA), wird die nächste geschützte Aminosäure vorzugsweise in einem 1,5 bis 3 fachen Überschuß in einem inerten, nichtwässrigen, polaren Lösungsmittel, wie Dichlormethan, DMF oder Mischungen aus beiden, vorzugsweise Dichlormethan, und Temperaturen von etwa 25°C an die vorhergehende gekuppelt. Als Kupplungsreagenzien kommen die bei der Kupplung der ersten  $N^{\alpha}$ -Boc-Aminosäure an das Benzhydrylamin-Harz bereits erwähnten Reagenzien in Frage. Wiederum können alternativ auch Aktivester der geschützten Aminosäure oder deren symmetrische Anhydride verwendet werden.

Die Seitenkettencyclisierung kann sowohl mit dem vom Trägermaterial abgespaltenen Peptid in der flüssigen Phase als auch mit dem an den Träger gebundenen Peptid nach Aufbau der gesamten Sequenz oder dem Aufbau einer Teilsequenz inclusive der beiden zu cyclisierenden Aminosäuren in einem inerten, nichtwässrigen, polaren Lösungsmittel, wie Dichlormethan, DMF oder Mischungen aus beiden, unter Verwendung der oben genannten Kupplungsreagenzien, Reaktionszeiten von 1 bis 12 Stunden, und geeigneten Schutzgruppen an den zu lactamisierenden Seitenketten durchgeführt werden.

Die verwendeten Schutzgruppen sollten unter den Bedingungen der Knüpfung von Amidbindungen stabil sein, sich aber ohne Verlust der übrigen Seitenkettenschutzgruppen in der Sequenz leicht abspalten lassen (Orthogonalität). Als geeignete Schutzgruppe für die  $\omega$ -Aminofunktion kann z. B. Allyl oder 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), vorzugsweise Fmoc, für die  $\omega$ -Carboxyifunktion der Allylester oder der 9-Fluorenylmethylester, vorzugsweise der 9-Fluorenylmethylester, verwendet werden. Die orthogonale Entschützung der zur Cyclisierung vorgesehenen Seitenketten kann dann durch Behandlung mit 10% bis 50% Piperidin in DMF,

vorzugsweise 20% Piperidin 1DMF, für 5 bis 20 Minuten, vorzugsweise 2 x 2 Minuten und 1 x 15 Minuten, erfolgen.

Vorzugsweise wird die Lactamisierung der Seitenketten auf dem polymeren Träger nach Aufbau des C-terminalen Teiles der Peptidsequenz, inclusive der beiden über die jeweilige Seitenkette zu cyclisierenden Aminosäuren, und der wie oben beschriebenen Abspaltung der orthogonalen Schutzgruppen, mit einem dreifachen Überschuß an TBTU in 1.5% DIEA/DMF und Reaktionszeiten von 4 Stunden durchgeführt. Nach erfolgtem Ringschluß wird die restliche Peptidsequenz wie oben beschrieben sukzessive gekuppelt.

Am Ende der Festphasensynthese wird das voll geschützte Peptid vom Trägermaterial abgespalten. Ist das Peptid über einen Benzylester mit der Festphase verbunden, und soll ein Peptid mit C-terminaler Alkylamidierung erhalten werden, so kann die Abspaltung über eine Aminolyse mit einem Alkylamin oder Fluoroalkylamin durchgeführt werden. Für Peptide mit einem unsubstituierten C-terminalen Amid eignen sich zur Aminolyse beispielsweise Ammoniak/Methanol oder Ammoniak/Ethanol Gemische. Die Aminolyse wird bei Temperaturen zwischen etwa -10°C und 50°C, vorzugsweise etwa 25°C, und Reaktionszeiten zwischen etwa 12 und 24 Stunden, vorzugsweise etwa 18 Stunden, durchgeführt. Peptide mit einer C-terminalen Carbonsäure können mit HF oder anderen stark sauren Medien oder durch Verseifung von der Festphase gespalten werden. Weiterhin kann das Peptid auch durch Umesterung, z. B. mit Methanol, gefolgt von einer Aminolyse oder Verseifung vom Träger gespalten werden. Das geschützte Peptid kann durch Chromatographie über Silicagel gereinigt werden.

Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen kann durch die Behandlung des geschützten Peptides mit den folgenden Reagenzien erfolgen: Wasserfreies, flüssiges Hydrogenfluorid in Gegenwart von Anisol oder anderen Fängern (Scavengern) für Carbonium-Ionen, Hydrogenfluorid/Pyridin Komplexe, Trifluormethansulfonsäure oder deren Trimethylsilylester in Trifluoressigsäure in Gegenwart von Scavengern, Tris(trifluoroacetyl)bor in Trifluoressigsäure, Reduktion mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle oder Polyvinylpyrrolidon, Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak. Vorzugsweise wird mit flüssigem Hydrogenfluorid und Anisol für 15 Minuten bis zu 2 Stunden, vorzugsweise etwa 1.5 Stunden und bei Temperaturen zwischen etwa -10°C und 10°C, vorzugsweise etwa 0°C, behandelt.

Für Peptide, welche auf dem Benzhydrylamin-Harz synthetisiert wurden, kann die Abspaltung vom polymeren Träger und die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen in einem Schritt mit Hilfe von flüssigem Hydrogenfluorid und Anisol, wie oben beschrieben, erfolgen.

Die erhaltene Lösung kann entsalzt werden (z. B. mit BioRad AG-3® Anionen Austauscher) und das erhaltene Peptid durch einzelne oder alle der folgenden chromatographischen Methoden gereinigt werden: Ionenaustausch über ein schwach basisches Harz in der Acetat Form; hydrophobe Adsorptionschromatographie an nicht derivatisierten Polystyrol/Divinylbenzol-Copolymeren (z. B. Amberlite® XAD); Adsorptionschromatographie an Silicagel; Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose; Verteilungschromatographie, z. B. an Sephadex® G-25; Gegenstromverteilungschromatographie; oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), insbesondere "reversedphase" HPLC an Octyl- oder Octadecylsilylsilica (ODS)-Phasen.

Zusammenfassend beinhaltet ein Teil der vorliegenden Erfindung Verfahren zur Darstellung von Polypeptiden, insbesondere seitenkettencyclisierten Polypeptiden, und deren pharmazeutisch verwendbaren Salzen. Diese Verfahren, welche zu physiologisch aktiven verkürzten, seitenkettencyclisierten Homologen und Analogen von PTH, vorzugsweise PTH(1-34), führen, setzen sich aus Verfahren zur sequentiellen Kondensation geschützter Aminosäuren auf einem geeigneten Trägermaterial, zur Lactamisierung der zu cyclisierenden Seitenkettenfunktionen, zur Abspaltung des Trägers und der Schutzgruppen, und zur Reinigung der erhaltenen Rohpeptide zusammen.

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung, ohne sie darauf einzuschränken.

#### Ausführungsbeispiele

Als analytische Methoden wurden folgende Verfahren verwendet: Die Aminosäurenanalyse wurde mit einem Aminosäureanalysator 420A der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. 50 bis 1000 pmol der zu analysierenden Probe wurden in 10 bis 40 µl Lösung auf den Probenträger aufgetragen und anschließend vollautomatisch in der Gasphase bei 160°C mit 6N Salzsäure 90 Minuten hydrolysiert, mit Phenylisothiocyanat derivatisiert und on-line über eine Microbore-HPLC analysiert. Massenspektroskopische Untersuchungen wurden an einem API III Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (SCIEX, Thornhill, Kanada) ausgerüstet mit Ionenspray Ionenquelle durchgeführt.

Die geschützten Aminosäurenderivate wurden von der Novabiochem GmbH (Bad Soden) bezogen.

#### Beispiel 1

Herstellung des cyclischen hPTH(1-34)-Fragmentes der Sequenz SEQ ID NO:6

SVSEIQLMHNLGOrnHLNEMERVEWLRKKLQDVHNF

Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn	Leu	Gly	
1				5					10			5
<hr/>												
Orn	His	Leu	Asn	Glu	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	
			15				20					10
<hr/>												
Arg	Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His	Asn	Phe			
25						30						15

Beispiel 1 wurde in einem 0,5 mmol Ansatz nach der Festphasenmethode auf 4-(Oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-polystyren(1%)divinylbenzol an einem Peptidsyntheseautomaten 430 A der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) synthetisiert. Die  $\alpha$ -Aminofunktionen waren t-Butyloxycarbonyl (Boc) geschützt. Als Seitenkettenschutzgruppen wurden Benzyl (Bzl) für Asp, Glu und Ser, tosyl (Tos) für Arg, Benzyloxymethyl (Bom) für His und 2-Chlorbenzyloxycarbonyl (Cl-Z) für Lys verwendet. Glu in Position 17 wurde als 9-Fluorenylmethylester (OFm), Orn in Position 13 durch 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) geschützt eingesetzt. Die sequentielle Kupplung der Aminosäuren erfolgte mit N, N-Diisopropylcarbodiimid 11-Hydroxy-benzotriazol (DIC/HOBt) nach dem Standardverfahren von Steward und Young. Nach der Kupplung jeder Aminosäure wurde mit einer Mischung aus Acetanhydrid und Diisopropylethylamin in N-Methylpyrrolidon acetyliert. Nach vollendeter Kupplung von Orn<sup>13</sup> wurde der sequentielle Aufbau der Peptidkette unterbrochen und die Seitenkettenschutzgruppen N<sup>6</sup>-Fmoc und  $\beta$ -OFm der Aminosäuren Orn<sup>13</sup> und Glu<sup>17</sup> mit 20% Piperidin in DMF abgespalten. Zur Cyclisierung wurde mit TBTU (1,5 mmol), HOBt (1,5 mmol) und DIEA (1% v/v) in DMF versetzt und 4 Stunden geschüttelt. Nach beendeter Cyclisierung wurde die restliche Peptidkette von Position 14 bis 1 sequentiell mit DIC/HOBt wie oben beschrieben gekuppelt. Die Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit wasserfreiem HF (25 ml) in der Gegenwart von Anisol (2,5 ml) für 30 min bei -10°C und weiteren 60 min bei 0°C. Nach Entfernen von HF am Vakuum wurde der Rückstand mit wasserfreiem Ether gewaschen und das Rohpeptid mit 10% Eisessig extrahiert. Gefriertrocknung des Extraktes aus 10% Eisessig ergab 900 mg des Rohpeptides. Das Rohpeptid wurde über reversed-phase HPLC mit einem Gradienten von 40%–65% CH<sub>3</sub>CN in 0,1% TFA gereinigt. Das Produkt eluierte in drei Fraktionen, welche vereinigt, eingengt und lyophilisiert eine Ausbeute von 65 mg eines weißen Feststoffs mit  $\geq$  95% Reinheit ergaben.

Aminosäurenanalyse: Asx 4.13 (4); Glx 6.08 (6); Lys 2.17 (2); Ile 1.02 (1); Phe 0.98 (1); Arg 2.24 (2); Met 2.04 (2); Ser 1.60 (2) teilweise Zerstörung während der Hydrolyse; Gly 1.01(1); Val 2.84 (3); Leu 5.12 (5); His 2.93 (3); Trp 1.01(1); Orn 1.02 (1).  
IS-MS: 4128.2.

Beispiel 2 45

Herstellung des cyclischen hPTH(1-34) Fragmentes der SEQ ID NO: 14

SVSEIQLNleHNLGOrnHLNENleERVEWLRKKLQDVHNF 50

Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Nle	His	Asn	Leu	Gly	
1				5					10			55
<hr/>												
Orn	His	Leu	Asn	Glu	Nle	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	
			15				20					60
<hr/>												
Arg	Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His	Asn	Phe			
25						30						65

Beispiel 2 wurde analog nach der für Beispiel 1 beschriebenen Methode synthetisiert. Es wurden 68 mg eines weißen Feststoffs mit einer Reinheit  $\geq$  95% erhalten.

# DE 195 08 672 A1

Aminosäurenanalyse: Asx 4.06 (4); Glx 5.93 (6); Lys 2.23 (2); Ile 0.90 (1); Phe 1.06 (1); Arg 2.22 (2); Nle 2.03 (2); Ser 1.52 (2) teilweise Zerstörung während der Hydrolyse; Gly 1.00 (1); Val 2.79 (3); Leu 5.19 (5); His 2.89 (3); Trp 1.03 (1); Orn 1.01 (1).  
IS-MS: 4092.1.

5

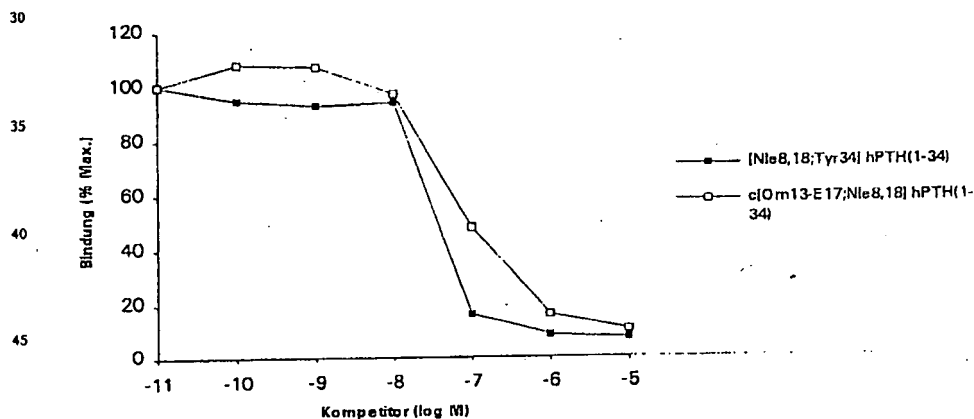
## Beispiel 3

### PTH-Bindungs-Assay

Die Zellkulturreagenzien wurden bei Boehringer Mannheim oder Gibco BRL gekauft, die Biochemica bei E. Merck, Darmstadt.  $[Nle^{8,18}, Tyr^{34}]$  hPTH(1-34) wurde von Sigma bezogen und von Amersham International plc, Buckinghamshire, England mit  $Na^{125}$  iodiert. Ros 17128 Zellen werden in einer 1 : 1 Mischung aus Ham's F-12 Medium und DMEM, die zusätzlich 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin und 10% fötales Kälberserum enthält, gezüchtet. Die Zellen werden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% rel. Luftfeuchte kultiviert und zweimal wöchentlich subkultiviert. Die Bindungsassays wurden nach Jüppner et al., J. Biol. Chem. 263, 8557 (1988) durchgeführt. Ros Zellen werden in der Konzentration von  $5 \times 10^4$  pro Vertiefung in einer 24-Loch Platte ausgesät. Das Medium wird alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht haben, wird das Medium für drei aufeinanderfolgende Tage täglich gewechselt. Für die Bindungsassays werden die Zellen mit Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.7, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5% hitzeinaktiviertes Pferdeserum, 5% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum) gewaschen. Radioaktives ( $Nle^{8,18}, Tyr^{34}$ ) hPTH(1-34) (0.5 ml,  $2 \times 10^5$  cpm/ml) und nichtmarkierter Kompetitor (gelöst in Bindungspuffer) werden für 4 Stunden bei 15°C zugegeben. Die Lösung wird entfernt und die Zellen werden dreimal mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen. Mit 0.5 ml 0.2 M NaOH wird lysiert und die Radioaktivität gemessen.

Durch Kompetitionsexperimente konnte gezeigt werden (Abb. 1), daß die Bindungsfähigkeit des cyclisierten [Orn<sup>13</sup>-E17; Nle<sup>8,18</sup>] hPTH(1-34) (entspricht SEQ NO. 14) sich nur unwesentlich von der des Vergleichsfragmentes unterscheidet.

### Kompetitionskurve



50

### Sequenzprotokoll

#### 1) Allgemeine Angaben

55

##### i) Anmelder:

A) Name: Boehringer Mannheim GmbH

B) Straße: Sandhofer Str. 116

C) Ort: Mannheim

60

E) Land: Germany

F) Postleitzahl: 68298

G) Telefon: 06211759-2019

H) Telefax: 06211759-4457

65

ii) Bezeichnung der Erfindung: Neue cyclische Parathormonfragmente, Verfahren zu deren Herstellung und diese enthaltende Arzneimittel

iii) Anzahl der Sequenzen: 14

iv) Computer — lesbare Fassung:

A) Datenträger: Floppy disk



# DE 195 08 672 A1

B) Computer: IBM PC compatible  
 C) Betriebssystem: PC—DOS/MS—DOS  
 D) Software: Patent in Release # 1.0, Version # 1.30 (EPA)

## 2) Angaben zu SEQ ID NO: 1

i) Sequenzkennzeichen  
 A) Länge: 34 Aminosäuren  
 B) Art: Aminosäure  
 C) Strangform: Einzelstrang  
 D) Topologie: linear  
 ii) Art des Moleküls: Peptid  
 xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 1

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu  
 1 5 10 15

Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp  
 20 25 30

Val His Asn Phe

## 2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2

i) Sequenzkennzeichen:  
 A) Länge: 34 Aminosäuren  
 B) Art: Aminosäure  
 C) Strang Form: Einzelstrang  
 D) Topologie: linear  
 ii) Art des Moleküls: Peptid  
 xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 2:

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly Lys Lys Leu  
 1 5 10 15

Ser Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp  
 20 25 30

Val His Asn Phe

## 2) Angaben zu SEQ ID NO: 3

i) Sequenzkennzeichen:  
 A) Länge: 34 Aminosäuren  
 B) Art: Aminosäure  
 C) Strangform: Einzelstrang  
 D) Topologie: linear  
 ii) Art des Moleküls: Peptid  
 xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 3:

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu  
 1 5 10 15

Ala Ser Val Glu Arg Met Gln Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp  
 20 25 30

Val His Asn Phe

# DE 195 08 672 A1

2) Angaben zu SEQ ID NO: 4

i) Sequenzkennzeichen:  
 A) Länge: 34 Aminosäuren  
 B) Art: Aminosäure  
 C) Strangform: Einzelstrang  
 D) Topologie: linear  
 ii) Art des Moleküls: Peptid  
 xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 4:

5  
 10  
 15  
 20

Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn	Leu	Gly	Lys	His	Leu
1				5					10					15
Ser	Ser	Leu	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Gln	Asp
				20					25					30
Val	His	Asn	Phe											

2) Angaben zu SEQ ID NO: 5

i) Sequenzkennzeichen:  
 A) Länge: 34 Aminosäuren  
 B) Art: Aminosäure  
 C) Strangform: Einzelstrang  
 D) Topologie: linear  
 ii) Art des Moleküls: Peptid  
 xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 5:

25  
 30  
 35  
 40

Ser	Val	Ser	Glu	Met	Gln	Leu	Met	His	Asn	Leu	Gly	Glu	His	Arg
1				5					10					15
His	Thr	Val	Glu	Arg	Gln	Asp	Trp	Leu	Gln	Met	Lys	Leu	Gln	Asp
				20					25					30
Val	His	Ser	Ala											

2) Angaben zu SEQ ID NO: 6

i) Sequenzkennzeichen:  
 A) Länge: 34 Aminosäuren  
 B) Art: Aminosäure  
 C) Strangform: Einzelstrang  
 D) Topologie: cyclisch  
 ii) Art des Moleküls: Peptid  
 ix) Merkmal  
 A) Name/Schlüssel: Binding-site  
 B) Lage 13...17  
 xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 6:

45  
 50  
 55  
 60  
 65

Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn	Leu	Gly
1				5					10		
Orn	His	Leu	Asn	Glu	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu
		15					20				
Arg	Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His	Asn	Phe		
25					30						

# DE 195 08 672 A1

## 2) Angaben zu SEQ ID NO: 7

i) Sequenzkennzeichen:

A) Länge: 34 Aminosäuren

B) Art: Aminosäure

C) Strangform: Einzelstrang

D) Topologie: cyclisch

ii) Art des Moleküls: Peptid

ix) Merkmal

A) Name/Schlüssel: Binding-site

B) Lage: 13..17

xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 7:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly  
1 5 10

Orn His Leu Asn Asp Met Glu Arg Val Glu Trp Leu  
15 20

Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe  
25 30

## 2) Angaben zu SEQ ID NO: 8

i) Sequenzkennzeichen:

A) Länge: 34 Aminosäuren

B) Art: Aminosäure

C) Strangform: Einzelstrang

D) Topologie: cyclisch

ii) Art des Moleküls: Peptid

ix) Merkmal

A) Name/Schlüssel: Binding-site

B) Lage: 13..17

xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 8:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly  
1 5 10

Lys His Leu Asn Glu Met Glu Arg Val Glu Trp Leu  
15 20

Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe  
25 30

## 2) Angaben zu SEQ ID NO: 9

i) Sequenzkennzeichen:

A) Länge: 34 Aminosäuren

B) Art: Aminosäure

C) Strangform: Einzelstrang

D) Topologie: cyclisch

ii) Art des Moleküls: Peptid

ix) Merkmal

A) Name/Schlüssel: Binding-site

B) Lage: 13..17

xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 9:

DE 195 08 672 A1

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly  
1 5 10

5 Lys His Leu Asn Asp Met Glu Arg Val Glu Trp Leu  
15 20

10 Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe  
25 30

2) Angaben zu SEQ ID NO: 10

- 15 i) Sequenzkennzeichen:  
A) Länge: 34 Aminosäuren  
B) Art: Aminosäure  
C) Strangform: Einzelstrang  
D) Topologie: cyclisch  
20 ii) Art des Moleküls: Peptid  
ix) Merkmal  
A) Name/Schlüssel: Binding-site  
B) Lage: 13...17  
xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 10:

25 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly  
1 5 10

30 Glu His Leu Asn Orn Met Glu Arg Val Glu Trp Leu  
15 20

35 Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe  
25 30

2) Angaben zu SEQ ID NO: 11

- 40 i) Sequenzkennzeichen:  
A) Länge: 34 Aminosäuren  
B) Art: Aminosäure  
C) Strangform: Einzelstrang  
D) Topologie: cyclisch  
45 ii) Art des Moleküls: Peptid  
ix) Merkmal  
A) Name/Schlüssel: Binding-site  
B) Lage: 13...17  
xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 11:

50 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly  
1 5 10

55 Asp His Leu Asn Orn Met Glu Arg Val Glu Trp Leu  
15 20

60 Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe  
25 30

2) Angaben zu SEQ ID NO: 12

- 65 i) Sequenzkennzeichen:  
A) Länge: 34 Aminosäuren  
B) Art: Aminosäure  
C) Strangform: Einzelstrang

# DE 195 08 672 A1

D) Topologie: cyclisch  
 ii) Art des Moleküls: Peptid  
 ix) Merkmal  
 A) Name/Schlüssel: Binding-site  
 B) Lage: 13...17  
 xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 12:

5

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly  
 1 5 10

10

Glu His Leu Asn Lys Met Glu Arg Val Glu Trp Leu  
 15 20

15

Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe  
 25 30

2) Angaben zu SEQ ID NO: 13

20

i) Sequenzkennzeichen:  
 A) Länge: 34 Aminosäuren  
 B) Art: Aminosäure  
 C) Strangform: Einzelstrang  
 D) Topologie: cyclisch  
 ii) Art des Moleküls: Peptid  
 ix) Merkmal  
 A) Name/Schlüssel: Binding-site  
 B) Lage: 13...17  
 xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 13:

25

30

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly  
 1 5 10

35

Asp His Leu Asn Lys Met Glu Arg Val Glu Trp Leu  
 15 20

40

Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe  
 25 30

2) Angaben zu SEQ ID NO: 14

45

i) Sequenzkennzeichen:  
 A) Länge: 34 Aminosäuren  
 B) Art: Aminosäure  
 C) Strangform: Einzelstrang  
 D) Topologie: cyclisch  
 ii) Art des Moleküls: Peptid  
 ix) Merkmal  
 A) Name/Schlüssel: Binding-site  
 B) Lage: 13...17  
 xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 14:

50

55

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Asn Leu Gly  
 1 5 10

60

Orn His Leu Asn Glu Nle Glu Arg Val Glu Trp Leu  
 15 20

65

Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe  
 25 30

## Patentansprüche

1. Cyclische Parathormonfragmente umfassend die Aminosäuresequenzen von hPTH(1-34), bPTH(1-34), pPTH(1-34), rPTH(1-34) oder cPTH(1-34), die am C-terminalen Ende gegebenenfalls um bis zu vier Aminosäuren verlängert und am N-terminalen Ende gegebenenfalls um bis zu drei Aminosäuren verkürzt sein können, wobei die Cyclisierung jeweils zwischen den Aminosäuren der Positionen 13 und 17 vorliegt und entweder die Aminosäure in Position 13 L-Orn, D-Orn, L-Lys oder D-Lys ist, während die Aminosäure in Position 17 L-Glu, D-Glu, L-Asp oder D-Asp ist oder die Aminosäure in Position 13 L-Glu, D-Glu, L-Asp oder D-Asp ist, während die Aminosäure in Position 17 L-Orn, D-Orn, L-Lys oder D-Lys ist.
2. Parathormonfragmente nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Methionin durch Norleucin ersetzt ist.
3. Parathormonfragmente nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die C-terminale Aminosäure zur Stabilisierung der Fragmente ausgetauscht ist.
4. Parathormonfragmente nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß in der Aminosäuresequenz von hPTH(1-34) <sup>34</sup>Phe durch <sup>34</sup>Tyr ersetzt ist.
5. Parathormonfragmente nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die C-terminale Carboxylgruppe in freier Form oder in Form eines physiologisch verträglichen Salzes vorliegt oder amidiert ist und eine Gruppe der Formel  $-\text{CONR}^1\text{R}^2$  darstellt, wobei R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylgruppe bedeuten.
6. Parathormonfragmente nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Aminosäuresequenzen der SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 9, SEQ ID Nr. 10, SEQ ID Nr. 11, SEQ ID Nr. 12, SEQ ID Nr. 13 oder SEQ ID Nr. 14 aufweisen.
7. Verfahren zur Herstellung von cyclischen Parathormonfragmenten gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Festphasensynthese als erstes die geschützte C-terminale Aminosäure des herzustellenden Fragmentes an ein geeignetes Trägermaterial kuppelt, nach Abspaltung der Schutzgruppe der gekuppelten Aminosäure auf der Festphase die nächste geschützte Aminosäure an die vorhergehende kuppelt und so in der Reihenfolge fortführt, die der Aminosäuresequenz in dem herzustellenden Fragment entspricht, dann die Seitenkettencyclisierung mittels Lactamisierung entweder mit dem vom Träger abgespaltenen Peptid in der flüssigen Phase oder mit dem am Träger gebundenen Peptid nach Aufbau der gesamten Sequenz oder dem Aufbau einer Teilsequenz inclusive der beiden zu cyclisierenden Aminosäuren durchführt, am Ende der Synthese das voll geschützte Peptid vom Trägermaterial abspaltet, die Schutzgruppen abspaltet und die erhaltenen cyclischen Parathormonfragmente mit an sich bekannten Chromatographieverfahren reinigt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lactamisierung der Seitenketten auf dem Trägermaterial nach Aufbau des C-terminalen Teils der Peptidsequenz, inclusive der beiden über die jeweilige Seitenkette zu cyclisierenden Aminosäuren durchführt, und nach erfolgtem Ringschluß die restliche Peptidsequenz sukzessive kuppelt.
9. Arzneimittel enthaltend als aktiven Wirkstoff ein oder mehrere cyclische Parathormonfragmente gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen.
10. Arzneimittel nach Anspruch 9 mit calciumregulierender Wirkung.
11. Arzneimittel nach Anspruch 9 mit antiproliferativer Wirkung auf die epidermale Zellproliferation.